



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 39/095 // C07K 13/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/06861 (43) Date de publication internationale: 15 avril 1993 (15.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00905 (22) Date de dépôt international: 29 septembre 1992 (29.09.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/12177 3 octobre 1991 (03.10.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : QUENTIN-MILLET, Marie-José [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). (74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, bd des Batignolles, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: VACCINE FOR <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> INFECTIONS (54) Titre: VACCIN CONTRE LES INFECTIONS A <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> (57) Abstract <p>A pharmaceutical vaccine composition including at least a first and a second human transferrin-binding molecules as therapeutic agents, wherein said first molecule originates from a first <i>N. meningitidis</i> strain having a human transferrin receptor of which the lower molecular weight subunit (Tbp2) is recognized by an anti-receptor antiserum of <i>N. meningitidis</i> strain 2394 (receptor 2394) but not by an anti-receptor antiserum of <i>N. meningitidis</i> strain 2169 (receptor 2169); and at least one second molecule originating from a second <i>N. meningitidis</i> strain having a human transferrin receptor of which the lower molecular weight subunit (Tbp2) is recognized by a 2169 anti-receptor antiserum but not by a 2394 anti-receptor antiserum.</p> (57) Abrégé <p>Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de <i>N. meningitidis</i> qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche <i>N. meningitidis</i> 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de <i>N. meningitidis</i> 2169 (récepteur 2169); et au moins une deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de <i>N. meningitidis</i> qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	TG	Togo
DE	Allemagne	ML	Mali	UA	Ukraine
DK	Danemark	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Vaccin contre les infections à *Neisseria meningitidis*

5 La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention des méningites causées par *Neisseria meningitidis*.

10 D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, respectivement impliquées dans environ 40 et 50 % des cas de méningites bactériennes.

15 On dénombre en France, environ 600 à 800 cas par an de méningites à *N. meningitidis*. Aux Etats-Unis, le nombre de cas s'élève à environ 2 500 à 3 000 par an.

20 L'espèce *N. meningitidis* est sub-divisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une douzaine de sérogroupes, 90 % des cas de méningites sont attribuables à 3 sérogroupes : A, B et C.

25 Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les méningites à *N. meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogéniques chez les enfants de moins de 2 ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

30 Par contre, le polysaccharide de *N. meningitidis* groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous forme conjuguée ou non. Ainsi, il apparait hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites induites par *N. meningitidis* notamment du séro groupe B autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

35 A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis* ont déjà été proposées. Il s'agit en particulier du récepteur membranaire de la transferrine humaine.

D'une manière générale, la grande majorité des bactéries ont besoin de fer pour leur croissance et elles ont développé des systèmes spécifiques d'acquisition de ce métal. En ce qui concerne notamment *N. meningitidis* qui est un pathogène strict de l'homme, le fer ne peut être prélevé qu'à partir des protéines humaines de transport du fer telles que la transferrine et la lactoferrine puisque la quantité de fer sous forme libre est négligable chez l'homme (de l'ordre de : 10^{-18} M), en tout cas insuffisante pour permettre la croissance bactérienne.

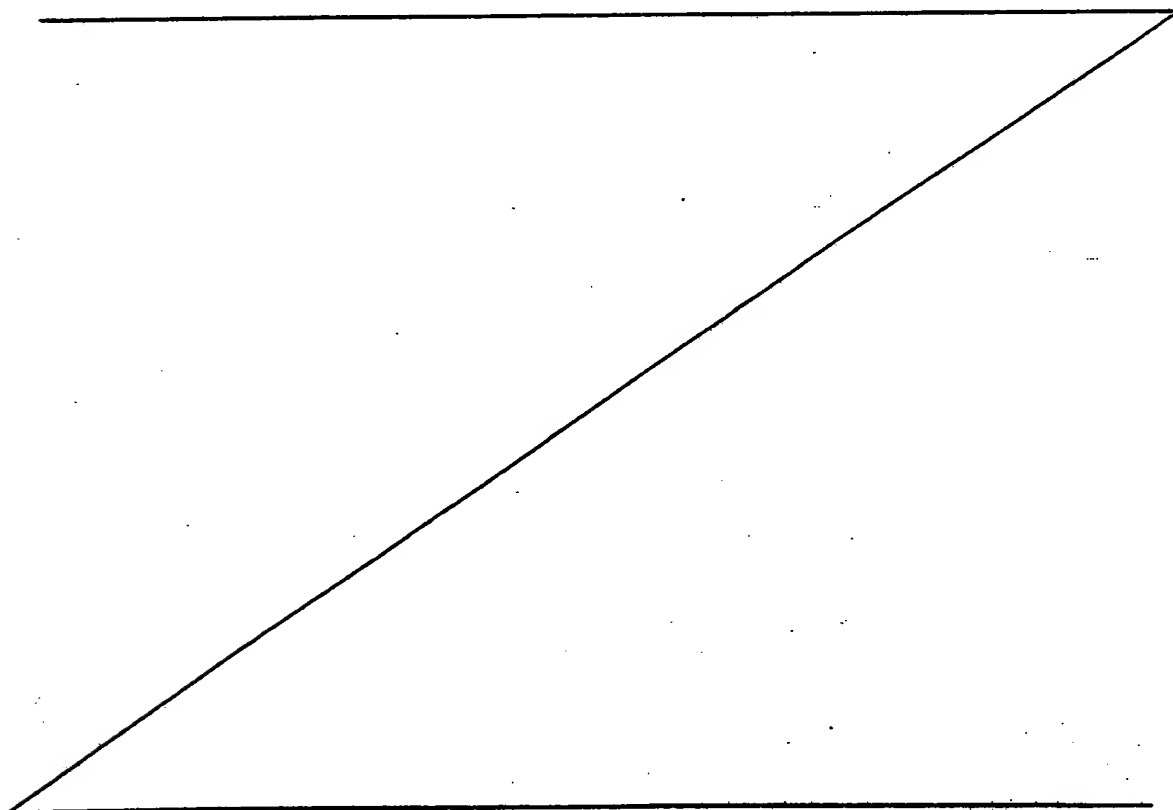
Ainsi, *N. meningitidis* possède un récepteur de la transferrine humaine et un récepteur de la lactoferrine humaine qui lui permettent de fixer ces protéines chélatrices du fer et de capter par la suite le fer nécessaire à sa croissance.

Le récepteur de la transferrine de la souche *N. meningitidis* B16B6 a été purifié par Schryvers et al (WO 90/12591) à partir d'un extrait membranaire. Cette protéine telle que purifiée apparaît essentiellement constituée de 2 types de polypeptides : un polypeptide d'un poids moléculaire apparent élevé de 100 kD et un polypeptide d'un poids moléculaire apparent moindre d'environ 70 kD, tels que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Le produit de la purification notamment mise en oeuvre par Schryvers est appelé, par définition arbitraire et pour les besoins de la présente demande de brevet, récepteur de la transferrine et les polypeptides le constituant, des sous-unités. Dans la suite du texte, les sous-unités de poids moléculaire élevé et de poids moléculaire moindre sont respectivement appelées Tbp1 et Tbp2.

On a maintenant trouvé qu'il existait au moins 2 types de souches qui diffèrent par la constitution de leurs récepteurs de la transferrine respectifs. Ceci a été mis en évidence en étudiant des extraits membranaires de plusieurs dizaines de souches de *N. meningitidis* d'origines variées. Ces extraits membranaires ont tout d'abord été soumis à une électrophorèse sur gel de SDS-PAGE, puis électrotransférés sur feuilles de nitrocellulose. Ces feuilles de nitrocellulose ont été incubées :

- a) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* B16B6, aussi appelée 2394 ;
- 5 b) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* 2169 ; ou
- c) en présence de la transferrine humaine conjuguée à la peroxydase.
- 10 En ce qui concerne a) et b), la reconnaissance des sous-unités du récepteur de la transferrine est révélée par addition d'un anticorps anti-immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase, puis par addition du substrat de cette enzyme.
- 15 Les tableaux I et II ci-après dessous indiquent le profil de certaines souches représentatives tel qu'il apparait sur gel de SDS-PAGE à 7,5 % polyacrylamide ; les bandes sont caractérisées par leur poids moléculaire apparent exprimé en kilodaltons (kD) :



	Souches		
Tableau I	2394 (B; 2a; P1.2:L2,3) 2228 (B; nd) 2170 (B; 2a; P1.2:L3)	2234 (Y; nd) 2154 (C; nd) 2448 (B; nd)	550 (C; 2a:) 179 (C; 2a: P1.2)
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394	93 68	93 69	99 69
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169	93	93	99
Détection avec la transferrine peroxydase	68	69	69

N.B. : Entre parenthèse sont indiqués dans l'ordre le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

	Souches								
Tableau II	2169 (B:9:P1.9)	1000 (B:nd)	1604 (B:nd)	132 (C:15:P1.16)	1001 (A:4:P1.9)	876 (B:19:P1.6)	1951 (A:nd)	2449 (B:nd)	867 (B:2b:P1.2)
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394	96	98	98	98	98	96	94	94	93
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169	96 87	98 85	98 83	98 81	98 79	96 88	94 87	94 85	93 85
Détection avec la transferrine- peroxydase	87	85	83	81	79	88	87	85	85

N.B. : Entre parenthèse sont indiqués dans l'ordre le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

Les résultats répertoriés dans les 2 premières lignes des tableaux montrent qu'il existe 2 types de souches :

5 Le premier type (Tableau I) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur 2394 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur 2169.

10 Le second type (Tableau II) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur 2169 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur 2394.

15 En conséquence, il existe une diversité antigénique au niveau de la sous-unité de moindre poids moléculaire. Cette diversité est toutefois restreinte puisqu'elle se résout en 2 grands types, contrairement à ce qui est suggéré par Griffiths et al, FEMS Microbiol. Lett. (1990) 69 : 31.

20 [Par ailleurs, on notera que quelque soit le type de souche, la sous-unité capable de se lier à la transferrine est toujours la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tableaux A et B, troisième ligne des résultats).]

25 En vertu de ces constatations, il eut été tentant de conclure qu'un vaccin efficace à l'encontre de toutes les infections à *N. meningitidis* pouvait être constitué de manière suffisante, d'un récepteur de la transferrine ou uniquement de sa sous-unité de haut poids moléculaire, quelle que soit la souche d'origine du récepteur, puisque cette dernière est reconnue par les 2 types d'antisérums.

30 De manière surprenante, on a maintenant trouvé que tel n'était pas le cas dans la mesure où la sous-unité de haut poids moléculaire ne serait pas capable d'induire la production d'anticorps de type neutralisant. Seule la plus petite des 2 sous-unités du récepteur serait capable de remplir cette fonction. Puisque cette sous-unité de moindre poids moléculaire se caractérise par une variation
35 antigénique significative du premier type au deuxième type de souche, un seul type de récepteur de la transferrine ne devrait pas être suffisant pour vacciner contre toutes les infections à *N. meningitidis*.

C'est pourquoi l'invention propose :

- 5 i) Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) et d'une sous-unité de poids moléculaire
- 10 moindre (Tbp2) et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine
- 15 humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394 ;
- 20 ii) Un kit de vaccination contenant :
- a) Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent thérapeutique au moins une première molécule capable de se lier à
- 25 la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire
- 30 moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ;
- b) Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent thérapeutique au moins une deuxième molécule capable de se lier à
- 35 la transferrine humaine ; ladite deuxième molécule ayant pour

origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394. ; et

c) Des instructions pour l'administration concomitante ou consécutive des compositions a) et b) ;

iii) L'usage thérapeutique combiné d'au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394 ; et

iv) Une méthode de vaccination à l'encontre des infections à *N. meningitidis*, qui comprend l'acte d'administrer une quantité efficace d'un point de vue thérapeutique d'au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine, de manière concomitante ou consécutive, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement vaccinal ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la

souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.

10

Par "molécule capable de se lier à la transferrine humaine", on entend soit un récepteur de la transferrine humaine ayant pour origine *N. meningitidis* (c'est-à-dire une molécule comprenant notamment 2 types de sous-unités) soit uniquement la sous-unité du récepteur, capable de se lier à la transferrine humaine, ainsi qu'un fragment ou un analogue de cette sous-unité.

15

Un récepteur de la transferrine peut être obtenu sous forme purifiée à partir d'une souche de *N. meningitidis* préalablement cultivée dans un milieu carencé en fer sous forme libre, notamment selon la méthode de Schryvers et al, WO 90/12591, décrite de manière similaire dans Schryvers et al, Infect. Immun. (1988) 56 (5) : 1144. De manière alternative, un récepteur de la transferrine ayant pour origine une souche de *N. meningitidis* peut être produit en mettant en oeuvre les techniques du génie génétique. Le ou les fragments d'ADN codant pour les sous-unités du récepteur peuvent être exprimés conjointement ou séparément dans un système d'expression hétérologue (e.g. bactérie, levure, cellule de mammifère). Les sous-unités sous forme libre ou associées sous forme de récepteur sont dans ce cas-là recueillies à partir d'une culture et purifiées. Lorsque les sous-unités sont ainsi produites sous forme libre, on peut prévoir de les réassocier sous forme de récepteur en les soumettant à un traitement approprié.

20

25

30

La sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine (sous-unité de moindre poids moléculaire) peut être obtenue sous forme purifiée (c'est-à-dire dissociée et isolée de la sous-unité de haut poids moléculaire) notamment à partir d'un récepteur purifié selon la méthode de Schryvers et al, en soumettant le récepteur à l'action d'un agent fortement dénaturant tel que l'urée 8M ou la guanidine HCl 6M, puis en séparant les sous-unités dissociées par des méthodes

35

chromatographiques classiques telles qu'une chromatographie d'échange d'ions ou de gel de filtration. De manière alternative, la sous-unité peut être produite selon les méthodes du génie génétique. Ces méthodes sont en outre parfaitement adaptées à la production des fragments ou des analogues de la sous-unité.

A titre d'exemple, les sous-unités Tbp1 et Tbp2 des souches 2394 et 2169 sont décrites par référence à leurs séquences d'acides aminés telles que montrées dans les identificateurs de séquences n° 1 à 4 (SEQ ID N° 1 à 4).

Par "fragment de la sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine", on signifie un peptide ayant une séquence d'acides aminés qui est incluse dans la séquence de la sous-unité. Par "analogue de la sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine", on signifie une protéine ayant une séquence d'acides aminés qui présente un degré d'homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, de manière tout à fait préférée d'au moins 95 % avec la séquence de la sous-unité. Aux fins de la présente invention, il est bien entendu qu'un tel fragment ou un tel analogue doit conserver les propriétés immunogènes de la sous-unité.

Les souches de *N. meningitidis* 2394 (B:2a:P1.2:L2.3) et 2169 (B:9:P1.9:L3.7), communément utilisées dans les laboratoires, sont publiquement disponibles auprès de la Collection de l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux 75015 Paris sous les numéros d'enregistrement respectifs CIP 7908 et CIP 7917.

De plus, les antisérums anti-récepteur qui sont requis afin de discriminer les souches de *N. meningitidis* peuvent être obtenus comme suit :

Un récepteur est tout d'abord purifié à partir d'une souche initiale (2394 ou 2169), selon la méthode de Schryvers et al. Des lapins néozélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 100 µg du récepteur en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 100 µg du récepteur purifié mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum des animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm. Le filtrat est par la suite épuisé par contact

avec la souche initiale qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer (dans ces conditions, la synthèse du récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à 10^{10} cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche initiale. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C, sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 2 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit.

Le type d'une souche (vis-à-vis de la nature de son récepteur de la transferrine) peut être identifié à partir d'extraits membranaires dérivés de cultures carencées en fer sous forme libre, en mettant en oeuvre des techniques conventionnelles telles que l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE, poursuivie par un immunoblotting utilisant un antisérum tel que précédemment décrit.

La première molécule entrant dans la composition vaccinale a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine essentiellement constitué (i) d'une sous-unité de haut poids moléculaire, de manière avantageuse de 100 à 90 kD, de préférence de 93-95 kD environ et (ii) d'une sous-unité de moindre poids moléculaire, de manière avantageuse de 75 à 60 kD, de préférence de 72 à 65 kD, et de manière tout à fait préférée respectivement (i) de 93 kD et (ii) de 67-70 kD environ.

La deuxième molécule entrant dans la composition vaccinale a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine essentiellement constitué (i) d'une sous-unité de haut poids moléculaire, de manière avantageuse de 100 à 90 kD, de préférence de 100 à 95 kD, de manière tout à fait préférée de 98 kD environ et (ii) d'une sous-unité de moindre poids moléculaire, de manière avantageuse de 90 à 80 kD, de préférence de 87 à 85 kD, de manière tout à fait préférée de 87 kD environ.

Les poids moléculaires indiqués ci-avant sont des poids moléculaires apparents tels que révélés après électrophorèse d'un récepteur purifié sur gel de SDS-PAGE. Une telle électrophorèse peut être mise en oeuvre selon la méthode de Laemmli illustrée comme suit :

On prépare tout d'abord un gel de polyacrylamide (16 cm x 20 cm x 1 mm d'épaisseur) comprenant un prégel à 5 % et un gel séparateur à 7,5 % dans du tampon d'électrophorèse (Tris 6 g/l, glycine 28,8 g/l, SDS 0,1 %).

5 D'autre part, à 50 µl d'une solution de récepteur purifié à 0,6 mg/ml (dans le tampon phosphate 50 mM pH 8.0 contenant du Sarkosyl à 0,05 %) sont ajoutés 50 µl de tampon échantillon (Tris-HCl 62 mM pH 6.8, SDS 2 %, β-mercaptoéthanol 5 %, glycérol 1 %, bleu de bromophénol 0,001 %). Le mélange est incubé pendant 5 min dans un bain d'eau en ébullition. 17 µl (soit
10 5 µg de protéine) de l'échantillon ainsi préparé sont déposés dans un puits du gel. On ajoute en parallèle, un échantillon préparé de manière similaire qui contient des marqueurs de poids moléculaire. L'électrophorèse est réalisée en tampon d'électrophorèse à 50 Volts pendant 15 heures. Le gel est fixé et coloré au bleu de Coomassie.

15 D'une manière générale, la première ou la deuxième molécule utile aux fins de la présente invention peut avoir pour origine une souche de *N. meningitidis* de n'importe quel séro groupe. De manière avantageuse, la première ou la deuxième molécule a pour origine une souche de *N. meningitidis*
20 séro groupe B. De préférence, la première et la deuxième molécules ont respectivement pour origine une première et une deuxième souches de *N. meningitidis* séro groupe B.

25 Selon un aspect de l'invention tout à fait préféré, la première molécule a pour origine la souche 2394 tandis que la deuxième molécule a pour origine la souche 2169.

30 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe le ou les agents thérapeutiques selon l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intra-musculaire ou par voie intra-veineuse, par exemple sous forme de suspension
35 injectable. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou

plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou du mode d'administration.

- 5 L'invention est décrite plus en détails dans les exemples ci-après et par référence à la Figure 1, qui représente une électrophorèse en gel SDS-PAGE en polyacrylamide 7,5 % dans laquelle les colonnes A et B correspondent aux récepteurs des souches *N. meningitidis* 2169 et 2394, respectivement. Les flèches à l'horizontale indiquent l'emplacement des protéines témoins de masse
- 10 moléculaire apparente connue (94 kD, phosphorilase B ; 67 kD, albumine).

EXEMPLE 1 : Purification du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2394

1A - Culture

5

Un lyophilisat de la souche *N. meningitidis* 2394 est repris dans environ 1 ml de bouillon Mueller-Hinton (BMH, Difco). La suspension bactérienne est ensuite étalée sur le milieu solide Muller-Hinton contenant du sang cuit (5 %).

10

Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10 % de CO₂, la nappe bactérienne est recueillie pour ensemer 150 ml de BMH pH 7,2, répartis en 3 erlens de 250 ml. L'incubation est poursuivie pendant 3 h à 37°C sous agitation. Chacune des 3 cultures ainsi réalisées permet d'ensemencer 400 ml de BMH pH 7,2 supplémentés avec 30 µm d'éthylènediamine - di (O - hydroxyphenyl - acetic acid) (EDDA, Sigma), qui est un agent chélatant du fer sous forme libre.

15

Après 16 h de culture à 37°C sous agitation, les cultures sont contrôlées pour leur pureté par observation au microscope après une coloration de Gram. La suspension est centrifugée, le culot contenant les germes est pesé et conservé à -20°C.

20

1B - Purification

25

La méthode de purification est essentiellement telle que décrite par Schryvers et al (supra).

30

Le culot bactérien obtenu en 1A est décongelé, puis remis en suspension dans 200 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 8.0 (tampon A). La suspension est centrifugée pendant 20 min à 15 000 xg à 4°C. Le culot est récupéré, puis remis en suspension dans du tampon A à la concentration finale de 150 g/l. Des fractions de 150 ml sont traitées pendant 8 min à 800 bars dans un lyseur de cellules travaillant sous haute pression (Rannie, modèle 8.30H). Le lysat cellulaire ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 15 000 xg. Le surnageant est récupéré, puis centrifugé pendant 75 min à 4°C à 200 000 xg.

35

Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon A et après dosage de protéines selon Lowry, la concentration de la suspension est ajustée à 5 mg/ml.

5 A 1,4 ml de la suspension de membranes on ajoute 1,75 mg de transferrine humaine biotynylée selon le procédé décrit par Schryvers. La concentration finale de la fraction membranaire est de 4 mg/ml. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C puis centrifugé à 100 000 xg pendant 75 min à 4°C. Le culot de membranes est repris par le tampon A contenant du NaCl 0,1M et incubé
10 pendant 60 min à température ambiante.

Après solubilisation, on ajoute à cette suspension un certain volume de N Lauroyl Sarkosine à 30 % (p/v) et d'EDTA 500 mM de façon que les concentrations finales en Sarkosyl et EDTA soient de 0,5 % et 5 mM
15 respectivement. Après une incubation de 15 min à 37°C sous agitation, on ajoute 1 ml de résine streptavidine-agarose (Pierce) préalablement lavée en tampon A. La suspension est incubée 15 min à température ambiante puis centrifugée à 1 000 xg pendant 10 min. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne et l'éluat direct est éliminé.

20 La résine est lavée par 3 volumes de colonnes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon B
25 contenant de la guanidine HCl 2M Sarkosyl 0,05 %. L'éluat est collecté en fraction dont le volume correspond à 1 Vol., dans des tubes contenant 1 Vol. de Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 1M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

30 Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0,05 % et lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau à une concentration 10 fois supérieure. La solution est dialysée une seconde fois contre du tampon phosphate 50 mM pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C) puis la
35 solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm.

Le contenu en protéines est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C.

5

EXEMPLE 2 : Purification du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2169.

10

La culture de la souche 2169 et la purification du récepteur de la transferrine sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'Exemple 1.

15

EXEMPLE 3 : Composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir des infections à *N. meningitidis*.

20

Les solutions stériles obtenues dans les Exemples 1 et 2 sont décongelées. Afin de préparer un litre de vaccin renfermant 100 µg/ml de chacun des principes actifs, on mélange stérilement les solutions suivantes :

25

30

35

- | | |
|--|---------|
| - Solution de récepteur 2394 à 1 mg/ml
dans du tampon C | 100 ml |
| - Solution de récepteur 2169 à 1 mg/ml
dans du tampon C | 100 ml |
| - Eau physiologique tamponnée (PBS)
à pH 6.0 | 300 ml |
| - Hydroxyde d'aluminium à 10 mg Al ⁺⁺⁺ /ml | 50 ml |
| - Merthiolate à 1 % (p/v) dans du PBS | 10 ml |
| - PBS qsp | 1000 ml |

EXEMPLE 4 : Mise en évidence de l'importance de la sous-unité de moindre poids moléculaire à titre d'agent vaccinal.

Des lapins néozélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 100 µg du récepteur 2394 ou 2169 (tel que obtenu dans l'Exemple 1 ou 2) en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 100 µg du récepteur purifié mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum de animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm. Le filtrat est par la suite épuisé par contact avec la souche initiale (2394 ou 2169) qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer sous forme libre (dans ces conditions, la synthèse du récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à 10¹⁰ cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche initiale. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C, sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 2 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit.

Une gamme de dilution de chacun des antisérums anti-récepteur 2394 et anti-récepteur 2169 est préparée en milieu M199 (Gibco). 200 µl de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une macroplaque de titrage (8x12in.). Un essai témoin est réalisé avec 200 µl de milieu M199. Dans chacun des puits on ajoute (i) 100 µl d'une culture en phase de croissance exponentielle d'une souche de *N. meningitidis*, en milieu Mueller-Hinton complémenté à 30 µM EDDA et (ii) 100 µl de complément (sérum de jeune lapin dilué).

Après 30 min d'incubation à 37°C sous agitation douce, on ajoute dans chaque puits, 1 ml de milieu Mueller-Hinton contenant 1 ml d'agar noble en surfusion. Après solidification du milieu, l'incubation est poursuivie 18-24 hrs à 37°C ; puis le nombre d'unités formant des colonies dans chaque puits est évalué. L'inverse de la dernière dilution d'antisérum en présence de laquelle on observe 50 % de lyse par rapport au témoin, correspond au titre bactéricide.

Les résultats sont présentés dans le Tableau III ci-dessous :

Activité Bactéricide				
	Lapin n° 1		Lapin n° 2	
5	Sérum avant immunisation 2394	Antisérum anti-récepteur	Sérum avant immunisation 2169	Antisérum anti-récepteur
	2394	< 8	2048	< 8
	2228	< 8	1024	< 8
10	2154	< 8	2048	< 8
	2234	< 8	2048	< 8
	2448	< 8	256	< 4
	2169	< 16	< 16	1024
15	896	< 8	< 8	65

L'antisérum anti-récepteur 2394 a une activité bactéricide uniquement à l'encontre des souches du premier type tel que défini dans la présente demande (2394, 2228, 2154, 2234 et 2448) tandis que l'antisérum anti-récepteur 2169 a une activité bactéricide uniquement à l'encontre des souches du second type (2169 et 876) Ceci suggère fortement que la production d'anticorps neutralisants est essentiellement induite par la sous-unité de moindre poids moléculaire qui porte la variabilité antigénique.

SEQ ID NO : 1

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 *N. meningitidis* 2394.

Cys	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Glu	Thr	1	5	10	15
Val	Gln	Asp	Met	His	Ser	Lys	Pro	Lys	Tyr	Glu	Asp	Glu	Lys	Ser	20	25	30	
Gln	Pro	Glu	Ser	Gln	Gln	Asp	Val	Ser	Glu	Asn	Ser	Gly	Ala	Ala	35	40	45	
Tyr	Gly	Phe	Ala	Val	Lys	Leu	Pro	Arg	Arg	Asn	Ala	His	Phe	Asn	50	55	60	
Pro	Lys	Tyr	Lys	Glu	Lys	His	Lys	Pro	Leu	Gly	Ser	Met	Asp	Trp	65	70	75	
Lys	Lys	Leu	Gln	Arg	Gly	Glu	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Glu	Arg	Asp	80	85	90	
Glu	Leu	Glu	Lys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Ile	Glu	Ser	Lys	95	100	105	
Trp	Glu	Asp	Gly	Gln	Ser	Arg	Val	Val	Gly	Tyr	Thr	Asn	Phe	Thr	110	115	120	
Tyr	Val	Arg	Ser	Gly	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asn	Lys	Asn	Asn	Ile	Asp	125	130	135	
Ile	Lys	Asn	Asn	Ile	Val	Leu	Phe	Gly	Pro	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	140	145	150	
Tyr	Lys	Gly	Lys	Glu	Pro	Ser	Lys	Glu	Leu	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	155	160	165	
Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Trp	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ala	Met	Glu	Lys	170	175	180	
Gln	Arg	Phe	Glu	Gly	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Lys	Ser	185	190	195	
Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Arg	Asn	Gln	Ala	200	205	210	
Glu	Ala	Ser	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Phe	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Phe	215	220	225	
Glu	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Lys	Thr	Ile	Lys	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	230	235	240	
Asn	Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Lys	Gln	Ile	Lys	245	250	255	

Thr Thr Arg Tyr	Thr 260	Ile Gln Ala	THR	Leu 265	His Gly Asn Arg	Phe 270
Lys Gly Lys Ala	Leu 275	Ala Ala Asp	Lys	Gly 280	Ala Thr Asn Gly	Ser 285
His Pro Phe Ile	Ser 290	Asp Ser Asp	Ser	Leu 295	Glu Gly Gly Phe	Tyr 300
Gly Pro Lys Gly	Glu 305	Glu Leu Ala	Gly	Lys 310	Phe Leu Ser Asn	Asp 315
Asn Lys Val Ala	Ala 320	Val Phe Gly	Ala	Lys 325	Gln Lys Asp Lys	Lys 330
Asp Gly Glu Asn	Ala 335	Ala Gly Pro	Ala	Thr 340	Glu Thr Val Ile	Asp 345
Ala Tyr Arg Ile	Thr 350	Gly Glu Glu	Phe	Lys 355	Lys Glu Gln Ile	Asp 360
Ser Phe Gly Asp	Val 365	Lys Lys Leu	Leu	Val 370	Asp Gly Val Glu	Leu 375
Ser Leu Leu Pro	Ser 380	Glu Gly Asn	Lys	Ala 385	Ala Phe Gln His	Glu 390
Ile Glu Gln Asn	Gly 395	Val Lys Ala	Thr	Val 400	Cys Cys Ser Asn	Leu 405
Asp Tyr Met Ser	Phe 410	Gly Lys Leu	Ser	Lys 415	Glu Asn Lys Asp	Asp 420
Met Phe Leu Gln	Gly 425	Val Arg Thr	Pro	Val 430	Ser Asp Val Ala	Ala 435
Arg Thr Glu Ala	Lys 440	Tyr Arg Gly	Thr	Gly 445	Thr Trp Tyr Gly	Tyr 450
Ile Ala Asn Gly	Thr 455	Ser Trp Ser	Gly	Glu 460	Ala Ser Asn Gln	Glu 465
Gly Gly Asn Arg	Ala 470	Glu Phe Asp	Val	Asp 475	Phe Ser Thr Lys	Lys 480
Ile Ser Gly Thr	Leu 485	Thr Ala Lys	Asp	Arg 490	Thr Ser Pro Ala	Phe 495
Thr Ile Thr Ala	Met 500	Ile Lys Asp	Asn	Gly 505	Phe Ser Gly Val	Ala 510
Lys Thr Gly Glu	Asn 515	Gly Phe Ala	Leu	Asp 520	Pro Gln Asn Thr	Gly 525
Asn Ser His Tyr	Thr 530	His Ile Glu	Ala	Thr 535	Val Ser Gly Gly	Phe 540
Tyr Gly Lys Asn	Ala 545	Ile Glu Met	Gly	Gly 550	Ser Phe Ser Phe	Pro 555
Gly Asn Ala Pro	Glu 560	Gly Lys Gln	Glu	Lys 565	Ala Ser Val Val	Phe 570
Gly Ala Lys Arg	Gln 575	Gln Leu Val	Gln			

SEO ID NO : 2

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp1 de *N. meningitidis* 2394.

Glu Asn Val Gln Ala Glu														
1 5														
Gln	Ala	Gln	Glu	Lys	Gln	Leu	Asp	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Ala	Lys
			10					15					20	
Lys	Gln	Lys	Thr	Arg	Arg	Asp	Asn	Glu	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Lys
			25					30					35	
Leu	Val	Lys	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Asn
			40					45					50	
Ile	Arg	Asp	Leu	Thr	Arg	Tyr	Asp	Pro	Gly	Ile	Ala	Val	Val	Glu
			55					60					65	
Gln	Gly	Arg	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Arg	Gly	Met	Asp
			70					75					80	
Lys	Asn	Arg	Val	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Gln
			85					90					95	
Ser	Tyr	Thr	Ala	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Arg	Thr	Ala	Gly
			100					105					110	
Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Glu	Ile	Glu	Tyr	Glu	Asn	Val	Lys	Ala
			115					120					125	
Val	Glu	Ile	Ser	Lys	Gly	Ser	Asn	Ser	Ser	Glu	Tyr	Gly	Asn	Gly
			130					135					140	
Ala	Leu	Ala	Gly	Ser	Val	Ala	Phe	Gln	Thr	Lys	Thr	Ala	Ala	Asp
			145					150					155	
Ile	Ile	Gly	Glu	Gly	Lys	Gln	Trp	Gly	Ile	Gln	Ser	Lys	Thr	Ala
			160					165					170	
Tyr	Ser	Gly	Lys	Asp	His	Ala	Leu	Thr	Gln	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
			175					180					185	
Gly	Arg	Ser	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Lys	Arg
			190					195					200	
Arg	Gly	Arg	Glu	Ile	His	Ala	His	Lys	Asp	Ala	Gly	Lys	Gly	Val
			205					210					215	
Gln	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys	Glu	Gly
			220					225					230	
Gly	Ser	Gln	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Ile	Val	Glu	Glu	Glu	Cys	His	Asn
			235					240					245	
Gly	Tyr	Ala	Ala	Cys	Lys	Asn	Lys	Leu	Lys	Glu	Asp	Ala	Ser	Val
			250					255					260	

Lys	Asp	Glu	Arg	Lys	Thr	Val	Ser	Thr	Gln	Asp	Tyr	Thr	Gly	Ser	
			265					270					275		
Asn	Arg	Leu	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Gln	Ser	Trp	
			280					285					290		
Leu	Phe	Arg	Pro	Gly	Trp	His	Leu	Asp	Asn	Arg	His	Tyr	Val	Gly	
			295					300					305		
Ala	Val	Leu	Glu	Arg	Thr	Gln	Gln	Thr	Phe	Asp	Thr	Arg	Asp	Met	
			310					315					320		
Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Thr	Ser	Glu	Asp	Tyr	Val	Pro	Gly	Ser	
			325					330					335		
Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Gly	Asp	Asn	Lys	Ala	Glu	Arg	
			340					345					350		
Leu	Phe	Val	Gln	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	Gly	Ile	Gly	Tyr	
			355					360					365		
Gly	Thr	Gly	Val	Phe	Tyr	Asp	Glu	Arg	His	Thr	Lys	Asn	Arg	Tyr	
			370					375					380		
Gly	Val	Glu	Tyr	Val	Tyr	His	Asn	Ala	Asp	Lys	Asp	Thr	Trp	Ala	
			385					390					395		
Asp	Tyr	Ala	Arg	Leu	Ser	Tyr	Asp	Arg	Gln	Gly	Ile	Asp	Leu	Asp	
			400					405					410		
Asn	Arg	Leu	Gln	Gln	Thr	His	Cys	Ser	His	Asp	Gly	Ser	Asp	Lys	
			415					420					425		
Asn	Cys	Arg	Pro	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Lys	Ser	
			430					435					440		
Asp	Arg	Met	Ile	Tyr	Glu	Glu	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Gln	Ala	Val	
			445					450					455		
Phe	Lys	Lys	Ala	Phe	Asp	Thr	Ala	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Leu	Ser	
			460					465					470		
Ile	Asn	Leu	Gly	Tyr	Asp	Arg	Phe	Lys	Ser	Gln	Leu	Ser	His	Ser	
			475					480					485		
Asp	Tyr	Tyr	Leu	Gln	Asn	Ala	Val	Gln	Ala	Tyr	Asp	Leu	Ile	Thr	
			490					495					500		
Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Phe	Pro	Asn	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Tyr	
			505					510					515		
Arg	Val	Ser	Ile	Gly	Lys	Thr	Thr	Val	Asn	Thr	Ser	Pro	Ile	Cys	
			520					525					530		
Arg	Phe	Gly	Asn	Asn	Thr	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Pro	Arg	Asn	Ile	
			535					540					545		
Gly	Gly	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Val	Gln	Asp	Asn	Val	Arg	Leu	
			550					555					560		
Gly	Arg	Trp	Ala	Asp	Val	Gly	Ala	Gly	Ile	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Arg	
			565					570					575		
Ser	Thr	His	Ser	Glu	Asp	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Gly	Thr	His	Arg	
			580					585					590		

Asn Leu Ser Trp Asn Ala Gly Val Val Leu Lys Pro Phe Thr Trp
 595 600 605
 Met Asp Leu Thr Tyr Arg Ala Ser Thr Gly Phe Arg Leu Pro Ser
 610 615 620
 Phe Ala Glu Met Tyr Gly Trp Arg Ala Gly Glu Ser Leu Lys Thr
 625 630 635
 Leu Asp Leu Lys Pro Glu Lys Ser Phe Asn Arg Glu Ala Gly Ile
 640 645 650
 Val Phe Lys Gly Asp Phe Gly Asn Leu Glu Ala Ser Tyr Phe Asn
 655 660 665
 Asn Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Ala Phe Gly Tyr Glu Thr Arg Thr
 670 675 680
 Gln Asn Gly Gln Thr Ser Ala Ser Gly Asp Pro Gly Tyr Arg Asn
 685 690 695
 Ala Gln Asn Ala Arg Ile Ala Gly Ile Asn Ile Leu Gly Lys Ile
 700 705 710
 Asp Trp His Gly Val Trp Gly Gly Leu Pro Asp Gly Leu Tyr Ser
 715 720 725
 Thr Leu Ala Tyr Asn Arg Ile Lys Val Lys Asp Ala Asp Ile Arg
 730 735 740
 Ala Asp Arg Thr Phe Val Thr Ser Tyr Leu Phe Asp Ala Val Gln
 745 750 755
 Pro Ser Arg Tyr Val Leu Gly Leu Gly Tyr Asp His Pro Asp Gly
 760 765 770
 Ile Trp Gly Ile Asn Thr Met Phe Thr Tyr Ser Lys Ala Lys Ser
 775 780 785
 Val Asp Glu Leu Leu Gly Ser Gln Ala Leu Leu Asn Gly Asn Ala
 790 795 800
 Asn Ala Lys Lys Ala Ala Ser Arg Arg Thr Arg Pro Trp Tyr Val
 805 810 815
 Thr Asp Val Ser Gly Tyr Tyr Asn Ile Lys Lys His Leu Thr Leu
 820 825 830
 Arg Ala Gly Val Tyr Asn Leu Leu Asn Tyr Arg Tyr Val Thr Trp
 835 840 845
 Glu Asn Val Arg Gln Thr Ala Gly Gly Ala Val Asn Gln His Lys
 850 855 860
 Asn Val Gly Val Tyr Asn Arg Tyr Ala Ala Pro Gly Arg Asn Tyr
 865 870 875
 Thr Phe Ser Leu Glu Met Lys Phe
 880

SEO ID NO : 3

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp1 de *N. meningitidis* 2169.

										Glu	Asn	Val	Gln	Ala	Gly
										1					5
Gln	Ala	Gln	Glu	Lys	Gln	Leu	Asp	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Ala	Lys	
			10					15					20		
Lys	Gln	Lys	Thr	Arg	Arg	Asp	Asn	Glu	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Lys	
			25					30					35		
Leu	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Asp	
			40					45					50		
Ile	Arg	Asp	Leu	Thr	Arg	Tyr	Asp	Pro	Gly	Ile	Ala	Val	Val	Glu	
			55					60					65		
Gln	Gly	Arg	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Arg	Gly	Met	Asp	
			70					75					80		
Lys	Asn	Arg	Val	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Ala	Gln	Ile	Gln	
			85					90					95		
Ser	Tyr	Thr	Ala	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Arg	Thr	Ala	Gly	
			100					105					110		
Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Glu	Ile	Glu	Tyr	Glu	Asn	Val	Lys	Ala	
			115					120					125		
Val	Glu	Ile	Ser	Lys	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	
			130					135					140		
Ala	Leu	Ala	Gly	Ser	Val	Ala	Phe	Gln	Tyr	Lys	Thr	Ala	Asp	Asp	
			145					150					155		
Val	Ile	Gly	Glu	Gly	Arg	Gln	Trp	Gly	Ile	Gln	Ser	Lys	Thr	Ala	
			160					165					170		
Tyr	Ser	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	
			175					180					185		
Gly	Arg	Ile	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Thr	Gly	Arg	
			190					195					200		
Arg	Ala	Gly	Glu	Ile	Arg	Ala	His	Glu	Asp	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	
			205					210					215		
Gln	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Pro	Val	Glu	Asp	Ser	Ser	Glu	Tyr	
			220					225					230		
Ala	Tyr	Phe	Ile	Val	Glu	Asp	Glu	Cys	Glu	Gly	Lys	Asn	Tyr	Glu	
			235					240					245		
Thr	Cys	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Lys	Asp	Val	Val	Gly	Lys	Asp	Glu	
			250					255					260		

Arg Gln Thr Val Ser Thr Arg Asp Tyr Thr Gly Pro Asn Arg Phe
 265 270 275
 Leu Ala Asp Pro Leu Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Trp Leu Phe Arg
 280 285 290
 Pro Gly Phe Arg Phe Glu Asn Lys Arg His Tyr Ile Gly Gly Ile
 295 300 305
 Leu Glu His Thr Gln Gln Thr Phe Asp Thr Arg Asp Met Thr Val
 310 315 320
 Pro Ala Phe Leu Thr Lys Ala Val Phe Asp Ala Asn Ser Lys Gln
 325 330 335
 Ala Gly Ser Leu Pro Gly Asn Gly Lys Tyr Ala Gly Asn His Lys
 340 345 350
 Tyr Gly Gly Leu Phe Thr Asn Gly Glu Asn Gly Ala Leu Val Gly
 355 360 365
 Ala Glu Tyr Gly Thr Gly Val Phe Tyr Asp Glu Thr His Thr Lys
 370 375 380
 Ser Arg Tyr Gly Leu Glu Tyr Val Tyr Thr Asn Ala Asp Lys Asp
 385 390 395
 Thr Trp Ala Asp Tyr Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Arg Gln Gly Ile
 400 405 410
 Gly Leu Asp Asn His Phe Gln Gln Thr His Cys Ser Ala Asp Gly
 415 420 425
 Ser Asp Lys Tyr Cys Arg Pro Ser Ala Asp Lys Pro Phe Ser Tyr
 430 435 440
 Tyr Lys Ser Asp Arg Val Ile Tyr Gly Glu Ser His Arg Leu Leu
 445 450 455
 Gln Ala Ala Phe Lys Lys Ser Phe Asp Thr Ala Lys Ile Arg His
 460 465 470
 Asn Leu Ser Val Asn Leu Gly Phe Asp Arg Phe Asp Ser Asn Leu
 475 480 485
 Arg His Gln Asp Tyr Tyr Tyr Gln His Ala Asn Arg Ala Tyr Ser
 490 495 500
 Ser Lys Thr Pro Pro Lys Thr Ala Asn Pro Asn Gly Asp Lys Ser
 505 510 515
 Lys Pro Tyr Trp Val Ser Ile Gly Gly Gly Asn Val Val Thr Gly
 520 525 530
 Gln Ile Cys Leu Phe Gly Asn Asn Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Pro
 535 540 545
 Arg Ser Ile Asn Gly Lys Ser Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Asp Asn
 550 555 560
 Val Arg Leu Gly Arg Trp Ala Asp Val Gly Ala Gly Leu Arg Tyr
 565 570 575

Asp Tyr Arg Ser Thr His Ser Asp Asp Gly Ser Val Ser Thr Gly
 580 585 590
 Thr His Arg Thr Leu Ser Trp Asn Ala Gly Ile Val Leu Lys Pro
 595 600 605
 Ala Asp Trp Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Thr Ser Thr Gly Phe Arg
 610 615 620
 Leu Pro Ser Phe Ala Glu Met Tyr Gly Trp Arg Ser Gly Val Gln
 625 630 635
 Ser Lys Ala Val Lys Ile Asp Pro Glu Lys Ser Phe Asn Lys Glu
 640 645 650
 Ala Gly Ile Val Phe Lys Gly Asp Phe Gly Asn Leu Glu Ala Ser
 655 660 665
 Trp Phe Asn Asn Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Val Arg Gly Tyr Glu
 670 675 680
 Ala Gln Ile Lys Asn Gly Lys Glu Glu Ala Lys Gly Asp Pro Ala
 685 690 695
 Tyr Leu Asn Ala Gln Ser Ala Arg Ile Thr Gly Ile Asn Ile Leu
 700 705 710
 Gly Lys Ile Asp Trp Asn Gly Val Trp Asp Lys Leu Pro Glu Gly
 715 720 725
 Trp Tyr Ser Thr Phe Ala Tyr Asn Arg Val His Val Arg Asp Ile
 730 735 740
 Lys Lys Arg Ala Asp Arg Thr Asp Ile Gln Ser His Leu Phe Asp
 745 750 755
 Ala Ile Gln Pro Ser Arg Tyr Val Val Gly Leu Gly Tyr Asp Gln
 760 765 770
 Pro Glu Gly Lys Trp Gly Val Asn Gly Met Leu Thr Tyr Ser Lys
 775 780 785
 Ala Lys Glu Ile Thr Glu Leu Leu Gly Ser Arg Ala Leu Leu Asn
 790 795 800
 Gly Asn Ser Arg Asn Thr Lys Ala Thr Ala Arg Arg Thr Arg Pro
 805 810 815
 Trp Tyr Ile Val Asp Val Ser Gly Tyr Tyr Thr Ile Lys Lys His
 820 825 830
 Phe Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Leu Leu Asn Tyr Arg Tyr
 835 840 845
 Val Thr Trp Glu Asn Val Arg Gln Thr Ala Gly Gly Ala Val Asn
 850 855 860
 Gln His Lys Asn Val Gly Val Tyr Asn Arg Tyr Ala Ala Pro Gly
 865 870 875
 Arg Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Glu Met Lys Phe
 880 885

SEO ID NO : 4

Objet : Sequence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 de *N. meningitidis* 2169.

						Cys 1	Leu	Gly	Gly	Gly 5	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu 10
Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Glu 15	Ala	Pro	Arg	Pro 20	Ala	Pro	Lys	Tyr	Gln 25	
Asp	Val	Ser	Ser	Glu	Lys 30	Pro	Gln	Ala	Gln 35	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly 40	
Tyr	Gly	Phe	Ala	Met	Arg 45	Leu	Lys	Arg	Arg 50	Asn	Trp	Tyr	Pro	Gly 55	
Ala	Glu	Glu	Ser	Glu	Val 60	Lys	Leu	Asn	Glu 65	Ser	Asp	Trp	Glu	Ala 70	
Thr	Gly	Leu	Pro	Thr	Lys 75	Pro	Lys	Glu	Leu 80	Pro	Lys	Arg	Gln	Lys 85	
Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Val 90	Glu	Thr	Asp	Gly 95	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr 100	
Ser	Ser	Pro	Tyr	Leu	Thr 105	Pro	Ser	Asn	His 110	Gln	Asn	Gly	Ser	Ala 115	
Gly	Asn	Gly	Val	Asn	Gln 120	Pro	Lys	Asn	Gln 125	Ala	Thr	Gly	His	Glu 130	
Asn	Phe	Gln	Tyr	Val	Tyr 135	Ser	Gly	Trp	Phe 140	Tyr	Lys	His	Ala	Ala 145	
Ser	Glu	Lys	Asp	Phe	Ser 150	Asn	Lys	Lys	Ile 155	Lys	Ser	Gly	Asp	Asp 160	
Gly	Tyr	Ile	Phe	Tyr	His 165	Gly	Glu	Lys	Pro 170	Ser	Arg	Gln	Leu	Pro 175	
Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Ile 180	Tyr	Lys	Gly	Val 185	Trp	His	Phe	Val	Thr 190	
Asp	Thr	Lys	Lys	Gly	Gln 195	Asp	Phe	Arg	Glu 200	Ile	Ile	Gln	Pro	Ser 205	
Lys	Lys	Gln	Gly	Asp	Arg 210	Tyr	Ser	Gly	Phe 215	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser 220	
Glu	Glu	Tyr	Ser	Asn	Lys 225	Asn	Glu	Ser	Thr 230	Leu	Lys	Asp	Asp	His 235	
Glu	Gly	Tyr	Gly	Phe	Thr 240	Ser	Asn	Leu	Glu 245	Val	Asp	Phe	Gly	Asn 250	
Lys	Lys	Leu	Thr	Gly	Lys 255	Leu	Ile	Arg	Asn 260	Asn	Ala	Ser	Leu	Asn 265	

Asn	Asn	Thr	Asn	Asn	Asp	Lys	His	Thr	Thr	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Leu	270	275	280
Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Phe	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	285	290	295
Thr	Asp	Lys	Lys	Glu	Asn	Glu	Thr	Lys	Leu	His	Pro	Phe	Val	Ser	300	305	310
Asp	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Phe	Phe	Gly	Pro	Gln	Gly	Glu	315	320	325
Glu	Leu	Gly	Phe	Arg	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Gln	Lys	Val	Ala	Val	330	335	340
Val	Gly	Ser	Ala	Lys	Thr	Lys	Asp	Lys	Leu	Glu	Asn	Gly	Ala	Ala	345	350	355
Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	360	365	370
Thr	Ser	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Val	375	380	385
Glu	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	Lys	Lys	Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Asn	Phe	390	395	400
Ser	Asn	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Met	Ile	Pro	Leu	405	410	415
Leu	Pro	Lys	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ala	Asp	Lys	Gly	420	425	430
Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Arg	Lys	Phe	Glu	His	Thr	Pro	435	440	445
Glu	Ser	Asp	Lys	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn	Gly	450	455	460
Ala	Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Gly	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Thr	465	470	475
Lys	Thr	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Cys	Cys	Ser	Asn	Leu	Asn	Tyr	Leu	480	485	490
Lys	Tyr	Gly	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Met	Gln	495	500	505
Ala	Gly	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Glu	Gln	Val	510	515	520
Glu	Gln	Ser	Met	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	Arg	Thr	Asp	Glu	Lys	Glu	525	530	535
Ile	Pro	Thr	Asp	Gln	Asn	Val	Val	Tyr	Arg	Gly	Ser	Trp	Tyr	Gly	540	545	550
His	Ile	Ala	Asn	Gly	Thr	Ser	Trp	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Asp	Lys	555	560	565
Glu	Gly	Gly	Asn	Arg	Ala	Glu	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Ala	Asp	Lys	570	575	580

Lys Ile Thr Gly Lys Leu Thr Ala Glu Asn Arg Gln Ala Gln Thr
585 590 595

Phe Thr Ile Glu Gly Met Ile Gln Gly Asn Gly Phe Glu Gly Thr
600 605 610

Ala Lys Thr Ala Glu Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Lys Asn Thr
615 620 625

Thr Arg Thr Pro Lys Ala Tyr Ile Thr Asp Ala Lys Val Lys Gly
630 635 640

Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala Glu Glu Leu Gly Gly Trp Phe Ala
645 650 655

Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Glu Lys Ala Thr Ala Thr Ser Ser
660 665 670

Asp Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala Lys
675 680 685

Arg Gln Gln Pro Val Gln
690

Revendications

1. Une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention ou à l'atténuation des effets d'une infection à *Neisseria meningitidis*, qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.
2. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 1, qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de haut poids moléculaire et la sous-unité de poids moléculaire moindre sont reconnues par un antisérum anti-récepteur 2394 ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de haut poids moléculaire et la sous-unité de poids moléculaire moindre sont reconnues par un antisérum anti-récepteur 2169.
3. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 1 ou 2, qui comprend à titre d'agent thérapeutiques, au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de

100 kD environ à 90 kD et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 75 kD à 60 kD ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité d'un poids moléculaire élevé de 100 kD environ à 90 kD et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 90 kD à 80 kD .

4. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 3, dans laquelle ladite première molécule a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 93-95 kD environ et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 72 kD à 65 kD.
5. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 4, dans laquelle ladite première molécule a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 93 kD environ et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 67-70 kD environ.
6. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 5, dans laquelle ladite deuxième molécule a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 100 kD environ à 95 kD et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 87 kD à 85 kD .
7. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 6, dans laquelle ladite deuxième molécule a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 98 kD environ et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 87 kD environ.
8. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la

transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est le récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche.

9. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité de moindre poids moléculaire.
10. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 9, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche.
11. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est le récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche.
12. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité de moindre poids moléculaire.
13. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 12, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche.

14. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 13, dans laquelle lesdites première et deuxième molécules ont respectivement pour origine une première et deuxième souches de *N. meningitidis* séro groupe B.

FIG. 1



FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ A61K 39/095; //C07K 13/00
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 1 November 1990 (cited in the application) see the whole document	1-14
A	WO, A, 8 702 678 (STATE OF OREGON) 7 May 1987 see the whole document	1-14
A	INFECTION AND IMMUNITY Vol. 58, No. 9 September 1990, WASHINGTON pages 2875-2881. NIRUPAMA B. B. ET AL "expression of neisseria meningitidis iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential for use as vaccines" cited in the application, see the whole document	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 1993 (15.01.93)

Date of mailing of the international search report

8 February 1993 (08.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200905
SA 66295

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 15/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A- 5526190	16-11-90
		US-A- 5141743	25-08-92
WO-A-8702678	07-05-87	US-A- 4681761	21-07-87
		AU-B- 594400	08-03-90
		AU-A- 6623286	19-05-87
		EP-A- 0245433	19-11-87
		JP-T- 63502427	14-09-88

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB.

CIB 5 A61K39/095; //C07K13/00**II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	WO,A,9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 1 Novembre 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-14
A	WO,A,8 702 678 (STATE OF OREGON) 7 Mai 1987 voir le document en entier ---	1-14
	-/-	

⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date^{"L"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.^{"A"} document qui fait partie de la même famille de brevets**IV. CERTIFICATION**

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 JANVIER 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08.02.93

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

FERNANDEZ Y BRA F.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁶		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>INFECTION AND IMMUNITY vol. 58, no. 9, Septembre 1990, WASHINGTON pages 2875 - 2881 NIRUPAMA B.B. ET AL 'expression of neisseria meningitidis iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential for use as vaccines' cité dans la demande voir le document en entier -----</p>	1-14